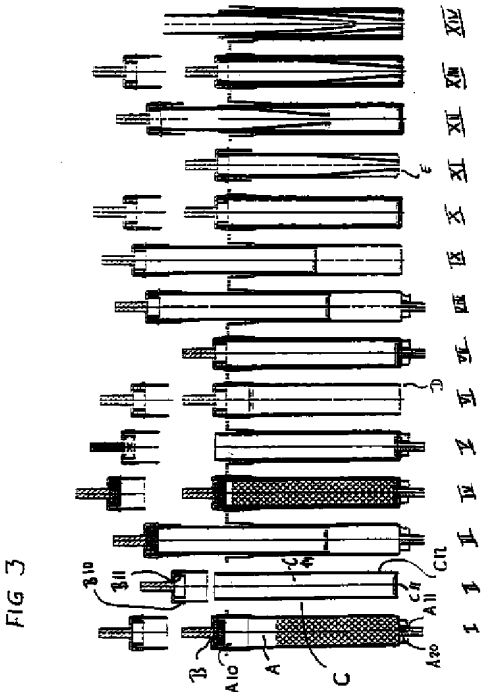


(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	F I	
C 1 2 Q	1/68	C 1 2 Q	1/68 A
C 1 2 M	1/00	C 1 2 M	1/00 A
G 0 1 N	1/04	G 0 1 N	1/04 G
	33/50		33/50 P
	35/04		35/04 H
		審査請求	未請求 予備審査請求 有 (全 46 頁)
(21)出願番号	特願平8-529951	(71)出願人	バーリンガー・マンハイム・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング ドイツ連邦共和国、デー-68298 マンハイム（番地なし）
(86) (22)出願日	平成8年(1996) 3月28日	(72)発明者	ビーンハウス、ゲルハルト ドイツ連邦共和国、デー-82407 ヴィーレンバッハ、カルヴェンデルシュトラッセ 1
(85)翻訳文提出日	平成9年(1997) 9月30日	(74)代理人	弁理士 朝日奈 宗太（外1名）
(86)国際出願番号	P C T / E P 9 6 / 0 1 3 6 8		
(87)国際公開番号	W O 9 6 / 3 1 7 8 1		
(87)国際公開日	平成8年(1996)10月10日		
(31)優先権主張番号	1 9 5 1 2 3 6 8 . 9		
(32)優先日	1995年4月1日		
(33)優先権主張国	ドイツ（DE）		
(81)指定国	EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), JP, US		
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 核酸のリリースと単離に用いるシステム

(57)【要約】

試料のバイオロジカルコンパートメントから核酸をリリースし、単離する処理が、1または2以上の試料処理槽をアクセプトし、当該サンプル処理槽をサーモスタットの制御および振動し、磁性粒子を磁氣的に分離するのに適しているデバイスを利用している。これにより核酸の単離が実質的に簡略化される。



【特許請求の範囲】

1. 試料をバイオロジカルコンパートメントと結合できる磁性粒子とともに、試料処理槽を振盪させながら、試料処理槽内でインキュベートし、

磁性粒子を該容器の壁に保持するため、磁石を試料処理槽の近くに配置し、残留流体を試料処理槽から取り出し、

a)磁石を移動させ試料処理槽から遠ざけて、磁性粒子が試料槽の壁にもはや保持されないようにし、同時に

b)試料処理槽を振盪させる

ことによって前記磁性粒子を第2流体中で再懸濁し、前記バイオロジカルコンパートメントを温め、

該溶解混合物を、単離または検出されるべき核酸を固定化するか、またはハイブリッドさせうる条件下で冷却する

工程からなる、試料のバイオロジカルコンパートメントから核酸を、リリースさせ、ついで単離または検出する操作方法。

2. 記載された工程の間に、核酸が前記槽から除去されないという事実によって特徴づけられてなる請求の範囲第1項記載の操作方法。

3. 前記記載された工程が1つの反応ブロック内で起きるという事実によって特徴づけられてなる請求の範囲第1項記載の操作方法。

4. 磁性粒子が $2.8\mu\text{m}$ より大きいという事実によって特徴づけられてなる請求の範囲第1項記載の操作方

法。

5. 1または2以上の試料処理槽のAを保持するための試料槽10,100のためのレセプタクルと、

試料処理槽Aおよび内容物を一定の温度に維持するためのサーモスタットユニット20と、

該試料処理槽Aを振盪するための機械的振盪機30と、磁力によって該試料処理Aのそれぞれの壁の上で磁性粒子を分離し、検出するための分離装置40

とを含み、互いに協働するように結合されてなる磁性粒子によってバイオロジ

カルコンパートメントの懸濁液から核酸をリリースおよび単離するためのシステム。

6. 前記試料処理槽 A から流体を取り除くために、ポンプユニット 50 をも含んでいるという事実によって特徴づけられてなる請求の範囲第 5 項記載のシステム。

7. 前記分離装置と、試料槽と保持するためのレセプタクルとが互いに向い合うか、または離間するように位置づけられているという事実によって特徴づけられてなる請求の範囲第 5 項または第 6 項記載のシステム。

8. 前記試料処理槽 A が、底部に出口 A 11 を有しているか、または吸入デバイスに連続されるという事実によって特徴づけられてなる請求の範囲第 5 項記載のシステム。

9. 多数の試料処理層 A を保持してなるという事実によって特徴づけられてなる請求の範囲第 5 項記載のシステム。

10. 前記試料容器 10, 100 のためのレセプタクルが、前記 1 または複数の試料処理槽軸 1 に基本的に垂直な面内

で偏心ドライブによって移動されるという事実によって特徴づけられてなる請求の範囲第 5 項記載のシステム。

11. 前記サーモスタットユニットが加熱ユニットおよびペルチェ要素を含んでいるという事実によって特徴づけられてなる請求の範囲第 5 項記載のシステム。

12. 前記試料処理槽とキャビティーが適合する円錐形状を有しているという事実によって特徴づけられてなる請求の範囲第 5 項記載のシステム。

【発明の詳細な説明】核酸のリリースと単離に用いるシステム

本発明の目的は、核酸のリリース (release) と単離に用いるシステムおよびこのシステムを使用するための操作方法に関する。

最近、試料中の核酸の測定に基づいた検出操作の重要性が増大している。これは、とりわけこれらの方法が達成できる検出感度が高いからである。感度については、核酸検出操作が抗原検出法より基本的に優れている。試料中の抗原は比較的アクセスしうることが多いが、核酸は、とくに微生物を検出するばあい、アクセスしうるようにするためには、通常多数の工程が必要である。そのうえ、核酸は、通常きわめて低い濃度で存在している。細胞を含む試料から核酸を単離するための精製法は、とくに知られているが、それらには多くの時間と労力が必要である。

現在、市場に出ている、試料の濃縮と前処理を行う核酸用システムの感度は、不十分なことが多い。そのうえ、自動化された試料前処理システムは、たとえばPCRを用いて増幅できるほど汚染に対して十分に安全ではない。現在入手できる自動化された試料前処理システムの他の欠点は、核酸を抽出するために有機溶媒（フェノールおよび／またはクロロホルムアルコールの混合物）を使用する必要がある、ということである。

現在使用されている、核酸を固定化する操作は、核酸を単離するために2つの原理を基本的に使用している。

一方の原理では、核酸を保持する固相を通して吸引される核酸を含んでいる液体試料が必要である。この工程のばあい、別の容器で行われる溶解工程から始まる。ついで、固体マトリックスを通して溶出液を吸引することによって、核酸を固体マトリックスから溶解する。核酸を含んでいる溶出液は、つぎの工程のために容器中に吸引される。しかしながら、現在使用されている装置の清浄性は、PCRなどのつぎの増幅反応に対する要件を満たしていないことが確認されている。

核酸単離の第2の原理では、核酸を沈降法によって除き、その後遠心分離器で分離する。しかしながら、この操作は"バッチ"モードでは実施できない。それど

ころか、まず、細胞を含有する溶液を反応容器内で溶解剤により処理する必要がある。つづいて、その反応混合物はピペットを用いて容器から遠心分離管に移される。この遠心分離管は、リリースした核酸を吸着しうる挿入物を含み、残留液は遠心分離中に管の底部に流動しうる。前記挿入物は、吸収された核酸を洗浄するために、1度または2度以上液体で処理される。この工程で、試料液体からの残留物が挿入物中に再び入らないように、その挿入物は第2の遠心分離管に移される。最後の工程で、挿入物をさらに別の容器の中に入れる。つぎに溶出溶液を挿入物を通して遠心分離し、当該核酸を、さらに処理できる溶液が入っている他の容器に移す。しかしながら、この方法はきわめて汚染を受けやすく、多数の反応容器に溶液を移しかえる必要がある。

本発明の目的は、現在の技術水準の欠点を完全にまたは少なくとも部分的に除いたシステムを提供することである。

ある。とくに本発明のシステムは、叙上の工程の遠心分離を必要とすることなく、固相マトリックスに核酸を吸収させ、ついで脱離させるのに使用できる。

本発明の主な特徴は、試料処理槽中に入っている物質を十分に混合するために、一定の温度に維持して始動させることができる試料処理槽のレセプタクルである。そのうえ、このレセプタクルは、真空発生システム（たとえば、ホースポンプまたはピストンポンプ）に接続されている。またそのレセプタクルによって、試料処理槽内の磁性粒子を分離することができるようになっている。本発明の重要な利点は、レセプタクルが試料間およびシステムと環境との間の汚染に対して防御し、かつ経費効率を保証するのに十分な数の試料処理槽を収納できることである。

また、本発明は、以下の工程、すなわち、
試料を、バイオロジカルコンパートメント(biological compartment)と結合できる磁性粒子とともに、試料処理槽を振盪させながら、試料処理槽内でインキュベートし、
磁性粒子を前記容器の壁に保持するため、磁石を試料処理槽の近くに配置し、
残留流体(fluid)を試料処理槽から除去し、

- a)磁石を移動させ試料処理槽から遠ざけて、磁性粒子が試料槽の壁にもはや保持されないようにし、同時に
- b)試料処理槽を振盪することによって前記磁性粒子を第2流体中で再懸濁し、前記バイオロジカルコンパートメントを温めて溶解し、溶解混合物を、単離もしくは検出されるべき核酸を固定

化するか、またはハイブリッドさせうる条件下で冷却する

工程で試料のバイオロジカルコンパートメントから核酸を、リリースさせ、ついで単離または検出する操作方法を提供するものである。

また本発明は、以下の工程、すなわち、
バイオロジカルコンパートメントを溶解するために、試料を磁性粒子とともに試料処理槽内でインキュベートし、えられた溶解混合物を冷却し、単離するかまたは検出されるべき核酸を磁性粒子上に固定化し、
固定化の状態を解除し、核酸をピペットで取り出すことができるレセプタクルに単離および精製すべき核酸を移す
工程でバイオロジカルコンパートメントの懸濁液から核酸を、磁性粒子を使ってリリースさせ単離する方法を提供するものである。

本発明のコンテキストに記載されている「核酸」という用語は、バイオロジカルコンパートメント中に存在する核酸を意味する。「バイオロジカルコンパートメント」は、たとえば、とくにウイルスまたは細菌由来の細胞を意味する。とくに好ましい態様では、これらの細胞は基本的に互いに別個になっている形態で存在している。しかしながら、原則として、本発明は多細胞のコンパートメントを処理することもできる。これらのコンパートメントおよびそれらの核酸は、本発明に記載されている操作方法の開始時には試料中に含有されている。この試料は、流体の状態のバイオロジカルコンパートメントの懸濁液が好ましい。これらの流体は、たとえば、血液、唾

液または尿などの体液からえることができる。

本発明のコンテキストに記載されている「核酸のリリース」という用語は、バ

イオロジカルコンパートメントからの核酸の放出(discharge)を意味する。核酸をバイオロジカルコンパートメントから放出させるのに任意の手段を使用することができる。バイオロジカルコンパートメントを流体から隔離する壁は破壊することが好ましい。このことは、たとえばコンパートメントを、プロテイナーゼKなどの細胞壁破壊剤で処理することによって達成することができる。

本発明のコンテキストに記載されている「核酸の単離」という用語は、試料中の他の成分から核酸を分離することを意味する。「試料中の他の成分」には、試料中のバイオロジカルコンパートメントの壁、その分解生成物、バイオロジカルコンパートメントの他の内容物、およびバイオロジカルコンパートメントを囲む流体の成分が含まれる。これら成分としては、タンパク質または酵素阻害物質、とくに核酸を分解する酵素、たとえばDNアーゼまたはRNアーゼなどが含まれる。この意味で、単離は核酸を精製する方法も意味する。この単離工程は、試料が含有している他の核酸に対して特異的であってもよくまた非特異的でもよい。

本発明のコンテキストに記載されている「核酸の検出」という用語は、核酸の存在または量を測定する操作方法を意味する。これらの操作方法は定量的にまたは定性的に実施することができる。定量的検出法は通常、既知量の被検核酸を含有する試料について比較試験を実施する必要がある。その検出は、配列に対し特異的な検出であ

ってもよくまたは配列に対して非特異的な検出でもよい。検出を特異的にするには、試料中の核酸に対して多少とも特有の塩基配列(nucleobase sequence)を有することを特徴とする「プローブ」を使用する。目標が核酸の特異的検出を実施することであるばあい、検査されるべき核酸の塩基配列に対して相補的であるが、試料中の他の核酸に対しては相補的でない塩基配列を含有するプローブを用いる。プローブは、直接または間接的に検出できる基を含有している分子でもよい。直接、検出できる基としては、放射性(^{32}P)、着色しているか蛍光を発する基または金属原子が挙げられる。間接的に検出できる基としては、たとえば抗体類、抗原類、ハプテン類、酵素類または酵素として活性なサブエンザイム類(sub

enzyme)などの免疫作用または酵素作用を有する化合物がある。これらの基はその後の1つの反応または一連の反応で検出される。とくに好ましいのはジゴキシゲニンまたはビオチンなどのハプテン類である。この種のハプテンで標識されたプローブは、そのハプテンに対する標識化抗体との反応で容易に検出することができる。

システムの説明

本発明の目的は、以下の要素を備えてなる、バイオリジカルコンパートメントの懸濁液から核酸をリリースおよび／または単離するシステムである。すなわち、

- 1以上の試料処理槽(A)を保持するレセプタクル(10)、
- 試料処理槽(A)とその中に入っている流体を一定温度に保つサーモスタット装置(20)、
- 試料処理槽(A)を振盪する機械的振盪器(30)、
- 磁力を使って磁性粒子を流体から分離してその磁性粒

子を各試料処理槽(A)の壁に堆積させる分離装置(40)、および

- 試料処理槽(A)から流体を取り出すポンプ装置(50)、

である。

本発明のシステムの表面は、清浄にしやすく、かつオペレータを火傷から守る(たとえば、プラスチック製ハウジングによって)。

本発明で述べられている装置からなるシステムの図面を図1と2に示す。

本発明のシステムは、試料処理槽を収納できるレセプタクル(10)を備えている。この容器には多数の凹所(12)すなわち“キャビティ”があり、その中に試料槽を入れる。これらのキャビティは好ましくはリニアに、またはリニアに互いに直角に配置されたサブグループで配置されている。キャビティ間の距離は、好ましくは、マイクロタイタープレートのウェルを隔てる距離と同じであり、一層好ましくは、この距離の2倍である。これらキャビティは試料処理槽を収納できるように設計されている。

試料処理槽(A)は、基本的には任意の形態または構造を有している。たとえ

ば、これら試料処理槽はマイクロタイタープレートのウェル（たとえば96ウェル）でもよい。しかしながら、これらの試料処理槽は、好ましくは、円筒形で頂部に流体を受入れる開口を有し、そしてもっとも好ましくは、流体が流出しうる開口（A11）を底部に備えている。この構造を有する試料処理槽を用いれば、核酸を含有する試料の処理中に起こる汚染を少なくすることができる。これら試料槽は、通常、ポリプロ

ピレンなどのプラスチック製である。

本発明のとくに好ましい態様で、ドイツ意匠出願第29505652.5号および第29505707.6号に記載されている槽を使用できる。

試料処理槽内の流体は、サーモスタット装置（20）によって、本発明に記載されているシステム内で一定温度に保持される。このサーモスタット装置は、基本的には、サーモスタット類に共通の部材からなり、試料処理槽を配置できるレセプタクル（10）に、少なくとも部分的に組み込まれている方が好ましい。とくにレセプタクル（10）は、熱伝導性に優れた金属ブロックで構成されている。この金属ブロック形状は、該容器内に配置される試料処理槽の壁が金属ブロック内にできるだけぴたりと嵌合して、熱が効果的に伝達しうるような方式で、試料処理槽の外側の輪郭と嵌合するよう設計されている。該ブロック内の温度は、試料処理槽内で行われる反応によって、上下させる。その温度は4℃～95℃の範囲内でよい。試料処理槽に対しできるだけ近くに配置した多数の電気発熱体を用いて温度を上げることが理想的である。試料処理槽中の流体は、試料処理槽に対しできるだけ近くに配置したペルチェ要素によって冷却される。温度は好ましくはファジィ調整器またはPID調整器によって調整される。十分な数の熱センサがサーモスタット装置内の適正な位置に設置されている。

サーモスタット装置（20）の別の態様としては流体が流れて通過するブロックがある。流体がインキュベーション用媒体として使用されるが、通常、水または生理的食塩水である。インキュベーション流体は、好ましくは、

加熱システムまたは冷却システムに接続された、たわみ管を通じて循環ポンプに

よって、ブロック (10) 内の開口 (21) に直接送られる。DNAモジュールの外側のインキュベーション槽 (図1に“加熱装置”と“冷却装置”で示してある) の容積は、2方弁が切り替えられるときに変化するその外乱を最小にするため、DNAモジュールの死容積よりはるかに大きくしてある。加熱装置と冷却装置が流体を一定温度に維持してから工程を開始し、そして必要に応じて特定の間隔において作動するようプログラムすることができる。調整器が、循環ポンプによって達成される適当な流量と相まって、叙上の弁および加熱装置と冷却装置を制御して、所望の加熱速度と冷却速度を維持する。この態様における“サーモスタット装置” (20) は、流体が流動するブロック、循環ポンプ、加熱装置、冷却装置および2方弁の組み合わせを意味する。“DNAモジュール”は、試料処理槽の容器、振盪装置および単離装置を備えた装置を意味する。

本発明のシステムは、磁性粒子 (ビーズ) を用いて作動させることができる。「磁性粒子」という用語は、磁力によって特定の方向へ運ぶことができる粒子を意味する。これらの粒子は、たとえば強磁性または超常磁性の材料製でもよい。本発明のばあい、とくに好ましくは、強磁性の材料である。この粒子は小直径の固体材料である。本発明のばあい、平均粒径が $2.8\mu\text{m}$ を超え $200\mu\text{m}$ 未満の粒子がとくに適している。もっとも好ましいのは、平均粒径が $10\sim 15\mu\text{m}$ の粒子である。粒径の分布は均一であることが好ましい。これらの粒子の表面は、バイオロジカルコンパートメントと結合できるように修飾され

る。この用途に適切な磁性粒子は、たとえば流体が結合することができる公知の市販されているラテックス磁性粒子である。とくに、バイオロジカルコンパートメントを磁性粒子に結合させるため、バイオロジカルコンパートメントの表面抗原に対する抗体を使用する。この種の磁性粒子も市販されている。

核酸が結合できる表面を有するガラス-磁気顔料 (glass-magnetic pigment) も使用できる。この種のガラス-磁気顔料は、ドイツ特許出願第19537985.3号によって公知である。

本発明に述べられている方法を成功裡に実施するためには、磁性粒子は、特定の反応工程中、試料処理槽の内壁に結合させ、次の工程で懸濁状態に戻さねばな

らない。本発明のとくに好ましい態様で、1つ以上の永久磁石または電磁石が取り付けられている分離装置(40)を、試料処理槽の方に移動させて前記磁石を配置する。分離を効果的に行うために必要な、磁石を試料処理槽から離す距離は、大部分、これら磁石が発生できる、磁界の強さ、磁性粒子の粒径、および磁化される磁性粒子の性能によって決まる。つぎの処理工程(たとえば、磁石に機械的応力をかける工程)の種類によって、利用される磁界の強さが決定される。永久磁石を用いるばあい、磁石は、磁性粒子を分離できない位置から試料槽の近くまで移動させて、磁性粒子を試料槽の壁に保持させる。電磁石が用いられるばあい、その電磁石は、スイッチをONにし、試料槽の壁に保持されたバイオリジカルコンパートメントが処理されるまで電力ONの状態にしておく。

「磁石を試料槽の近くに配置する」という用語は、試

料槽を磁石の近くに配置することを意味する。結局、これは単に磁石の試料槽に対する移動を意味する。

分離装置(40)は好ましくは、あらかじめ決められた経路に沿って、たとえば、レール上を、試料処理槽の方へ移動させることができる磁石を有し、または、磁石を円形トラック上、たとえば試料槽と並んでのびる軸線に沿って移動させてもよい。また分離装置は、磁石を駆動し、移動させて、試料処理槽の方へ近づけ、および該試料槽から離れさせることができる電動機を備えている。

他の様態で、分離装置(40)は、直流電動機またはステッピングモータによって、リニアに駆動することができるギヤラックを備えている。磁石を保持する装置(このばあいは永久磁石)は、ギヤラックに対して直角に配置される。磁石の運動の末端位置を検出するためにライトバリアー(light barrier)を用いてよい。好ましい態様では、磁石は1つずつ各試料処理槽に割り当て、磁石の全面を、試料槽の近くの位置まで移動させる。しかしながら、2つの磁石を各試料処理槽の近くの位置まで移動させてもよい。好ましくは、1つの磁石を2つの試料槽の近くの位置に移動させて、 $n+1$ 個の磁石だけが n 個の試料槽に必要であるようにする。

分離工程を行うばあい、これら磁石は、磁性粒子の高い分離速度をうるため、

試験試料槽のできるだけ近くまで移動させなければならない。また磁石がこれらの位置間を走行する距離は、充分長いことも重要である。使用される磁石の材料および幾何学的形状によって、これら磁石は、試料処理槽内の磁性粒子が思いがけない分離を起こすのを防止するため試料処理槽から40mm間で離して

おかねばならない。装置を適正に機能させるには、磁力は、所望のときに、試料処理槽内の粒子にのみ作用することが大切である。このことを達成するため、磁石が動かない位置は、磁界が粒子の移動にまったく作用しないように試料槽から充分離れていなければならない。

この作用は、磁石と試料処理槽の間の距離を変えない方式で達成することもできる。磁界は、 μ -金属を試料槽と磁石とのあいだの位置に移動させることによって、簡単に遮断できる。

他の可能な様態で、これら磁石は直流電動機で駆動される回転可能なシャフトに取りつけられている。この態様では、磁石は円形経路に沿って移動することができる。それら磁石自体は、試料処理槽に向かって、または処理槽から離れて移動させるようにこのシャフトに配置することができる。その上に、いくつかの磁石が取り付けられた1つのシャフトがそのシステムの各対向する側に設けられている駆動機構が好ましい。これらシャフトは、電動機で、ギヤラックによって駆動される。この配置のばあい、2つの磁石ごとに、試料処理槽の前面に向かって同期運動で移動する。本明細書に記載されている本発明の磁石は、好ましくは、重量が0.5~5gであり、とくに好ましくは1~4gである。プロトタイプの外形寸法は10mm×10mm×3mmである。永久磁石用に適していることが立証されている材料は、最小寸法で最適のBHが最大である希土類の材料（たとえば、NeFeB、VACODYM370HR）である。分離工程を効果的に進めるには、磁界の勾配がとくに大きいように設計すると有利である。このため、磁石は、試料槽に対しできるだけ近くに配置しなくてはなら

ない。試料処理槽は、磁界をできるだけわずかしき弱めない材料、たとえば、ポリプロピレンなどで製造することが好ましい。

真空発生装置に接続されている管 (51) が、試料処理槽を収納する該装置のキャビティの下側に取りつけられている。1本の管が各キャビティに割り当てられている。試料処理槽の底部に開口があるから、真空を発生させて、試料処理槽の内容物を吸引して廃棄物容器中にためることができる。図2に示す態様では、各キャビティに、廃棄物が吸引されるとき、試料処理槽と入口 (14) とのあいだの空間内に空気が導入されないようにするシールがある。

その真空装置は、基本的に、配管システムを通じてキャビティに接続されたピストンポンプ (50) で構成されている。流体を溜める廃棄物容器はピストンポンプとキャビティとのあいだに配置されている。試料処理槽から吸引された流体は不用である。そのうえ、すべての試料処理槽と廃棄物容器とのあいだに弁が設けられている。真空装置が廃棄物容器を過ぎて弁までポンプで、永久的に真空にしているばあい、前記の弁は、真空を各キャビティに切り替えることができる。本発明によって提供される構造によれば、試料処理槽から平行して連続的に吸引することができる。

他の態様では、ピストンポンプと弁の代わりにフローインデューサ (flow inducer) が用いられる。このばあい、廃棄物容器は、永久的に真空にすることなく、キャビティとフローインデューサに続いて流体の流れに設置されている。この配置のばあい、キャビティは平行して

のみ吸引される。また、特定の数のキャビティを操作して部分的に連続して作動させることができる多数のフローインデューサを使用することができる。

試料処理槽は、水平方向に移動させることが好ましい。とくに好ましい態様のばあい、レセプタクル (10) (1つの試料槽をそれぞれ収納できる凹所 (12) を有している) は移動させて、システム中のすべての試料槽を振盪させる。振動アブソーバ (11) は、装置の他の場所に移送する移動量を少なくするのに役立つ。本発明は、試料処理槽 (A) を運動させる機械振盪器 (30) を用いることが好ましい。この装置は、基本的には、試料槽内の流体を混合するのに適した機械装置である。このような好ましい実施例を以下に説明する。

固定棒体 (1) の上に設けられた、偏心カムと釣合い分銅を有するステッピン

グモータが、この枠体上の振動アブソーバの上に設置されているレセプタクルを、固定した振幅と可変周波数で、円形の偏心経路を移動させる。好ましい振幅Aは1.5m以下であり、好ましい周波数(f)は、1 Hzより大で、かつ50Hzより小さい。混合して再度懸濁させる工程は、試料物質の物理的特性によって、5ないし30s続く。振幅は前記偏心カムを取り替えて変えることができる。

本発明の提供するシステムを、自動ピペッティングシステムと組み合わせることは論理的な方法ではない。というのは、試料槽は、ピペッティング工程の前とその工程中、所定の位置に配置する必要があるからである。試料槽は、所定の位置に配置されていないばあい、振盪工程ののち、異なる位置に配置される。ピペッティング工

程中の試料槽の位置が正確に特定されていないばあい、ピペッティングを正しく実施することは不可能である。このため、本発明の装置は、振盪工程が終わった後、試料槽を所定の「ホーム」位置に確実に配置し、その位置から、ピペッティング工程または他のプロセスを実施することができる。

所定のホーム位置を保証するために、直流電動機の代わりにステッピングモータを使うと有利である。好ましい態様で、そのホーム位置はライトバリヤーで検出される。

本発明の装置は以下に説明するように、非侵襲的に設計することができる。しかしながら、これらの変形は構造が一層複雑であるか（バージョン1と2）または以下のことを完了するのに長期間かかる混合工程（3）を利用している。

すなわち、

1. 平面上または空間（X軸、Y軸およびZ軸）内の前記容器に対して1つ、2つまたは3つの線形駆動(linear drive)を組み合わせ、たとえば、リサージュ曲線を生成させる。
2. 特定の角度で枠体(1)を傾斜させて反対側の末端にレセプタクル(10)を配置することによって揺動させる。
3. 磁気攪拌機構
4. DNAモジュールの旋回またはタッピング(tapping)である。

本発明のシステムの部材は、たとえば、磁石をユニット (10) 内に組み込むことによって、作動できるような方式で連結されている。また本発明のシステムの部材は、

クロノロジカルに連結される。それら装置は、たとえばコンピュータのプログラムを通じてまたは個々に工程を開始するオペレータによって、所望の用途に必要な順序で運転される。

手順の説明

バージョンA

最初の工程で、試料を、バイオロジカルコンパートメントと結合できる磁性粒子 (ビーズ) とともに、試料処理槽内で、その槽を振盪させながらインキュベートする。

試料と磁性粒子のインキュベーションは、任意の方法で行うことができる。試料と磁性粒子を試料処理槽内に入れることが必要である。試料と磁性粒子を試料槽内に入れる方法もこれを行う順序も、本発明が提供する操作方法にとってとくに重要ではない。しかしながら、磁性粒子は、既知濃度の磁性粒子の懸濁液で、試料処理槽にピペットで採取して入れる。試料は、磁性粒子を懸濁させる前または懸濁させた後に、試料処理槽にピペッティングにより入れる。

この混合物は、充分な量のバイオロジカルコンパートメントが磁性粒子に結合するまで、適当な条件下通常1分~10分間インキュベートする。試料処理槽は、適確な方式、たとえば、キャップおよび／または弁で閉じることが好ましい。

本発明の重要な特徴は、試料処理槽中の前記混合物が、インキュベーションのあいだ、振盪されることである。その混合物は、時間間隔をおいて振盪してもよいし、またはすべてのインキュベーション期間中もしくは特定の期間だけ振盪してもよい。この混合物は、バイオロジカ

ルコンパートメントと磁性粒子とを流体中で充分混合して、とくにビーズを懸濁もしくは再懸濁させて、拡散を促進するために、振盪する。このようにすると、バイオロジカルコンパートメントを磁性粒子に結合させるのに必要な時間が短く

なる。

インキュベーション工程が終了し、バイオリジカルコンパートメントが磁性粒子に結合したのち、そのバイオリジカルコンパートメントを、試料中のまわりの流体から取り出す。これを達成する適当な方法は、磁石を試料処理槽の近くに配置することによって、磁性粒子および結合しているバイオリジカルコンパートメントを集める方法である。このようにして、バイオリジカルコンパートメントとともに磁性粒子が好ましい方式で試料槽の壁に保持される。したがって、これらビーズは、通常、試料処理槽の内壁上に分離されまたはビーズの一部は試料流体の液面の下方に位置している。

つぎに、バイオリジカルコンパートメントを囲む流体を試料処理槽から除く。これは磁性粒子が試料槽の壁に保持される条件下で実施される。試料を取り出すのに使用される方法は、使用される試料処理槽の種類によって決まる。流体は、たとえば、ピペットによって取り出すことができる。しかしながら、試料処理槽がその底部に流体が流出できる開口を備えている好ましい態様において、流体はこの開口を通して簡単に吸引される。この流体取り出し法によれば、磁性粒子に加わる機械的な応力が最小になるので、磁性粒子は試料槽の壁から外れない。

とくに重要な工程は、試料槽の壁上に保持されている磁性粒子を、添加される第2の流体中に再懸濁させる工

程である。これを達成するため、磁石を移動させて試料槽から離間させて、磁石がもはや磁性粒子を試料槽壁に保持しないようにする。叙上のように、試料槽を移動させて磁石から離間させることも可能である。本明細書に記載された本発明のばあい、磁石を単に移動させるだけでは、磁性粒子を溶液中に再懸濁させるには不十分であり、試料槽を好ましくは同時に振盪させなければならないことが確認された。この振盪運動は、機械的振盪器（30）によって実施される。この振盪運動によって、磁性粒子は第2の流体中に均一に分配される。この第2流体は、たとえば、磁石を移動させる前または後にピペットによって、試料処理槽に添加することができる。

本発明が提供する操作方法は、バイオリジカルコンパートメントをさらに精製

するためにも利用できる。これを達成するため、バイオリジカルコンパートメントと結合する磁性粒子の懸濁液が、バイオリジカルコンパートメントとともに磁性粒子が試料槽の壁に保持されるような方式で、試料処理槽中に磁石に対して配置される。つぎに、バイオリジカルコンパートメントを含有する流体を試料槽から取り出し、つぎに試料槽を振盪させながら、磁石を移動させて試料槽から離れさせて磁性粒子が試料槽壁にもはや保持されないようにすることによって、磁性粒子を第2流体（このばあいには洗浄液）中に再懸濁させる。この洗浄工程は、バイオリジカルコンパートメントが十分なレベルの純度に到達するまで必要なだけ繰り返すことができる。

本発明が提供する他の操作方法の工程では、続けてバイオリジカルコンパートメントの崩壊（溶解）が行われ

る。バイオリジカルコンパートメントを溶解する操作方は、特定の種類のバイオリジカルコンパートメント、たとえば細胞、に対する特別な条件である方法として当業者に公知である。たとえば、細菌を溶解するためには、プロテイナーゼKの混合物をバイオリジカルコンパートメントに添加し、つぎに必要な期間インキュベートして細胞壁を溶解するかまたは部分的にもしくは完全に分解し、バイオリジカルコンパートメントに含まれている核酸をリリースさせる。この操作は、室温を超える温度で行うことが好ましく、70～95℃の温度で行うことが一層好ましい。細胞が溶解されたとき生成する混合物は、以後、溶解混合物ともいう。インキュベート時間は5～20分間が好ましく、10～15分間がさらに好ましい。

細胞を室温または室温をわずかに超える温度で溶解したばあい、溶解混合物を70℃などの高温で温めることがとくに好ましく、試料が感染している可能性があるばあいは95℃まで加熱する。溶解によって、つぎの工程が妨害されるばあい、溶解は不活性化（deactivated）される。

つぎに溶解混合物を、本発明が提供する操作方法を実施する目的によって決まる条件下で冷却する。核酸を固相上で単離するばあい、核酸が固相に結合できる条件を選択する。核酸を結合させるのに適した操作は、リリースされた核酸をカオトロピック塩類の存在下でガラス表面とインキュベートする操作である。この

種の操作は、たとえば、ヨーロッパ特許出願公開第A-0389063号公報に記載されている。この方法のばあい、核酸はガラス表面に非特異的に結合するが、バイオリジカルコンパート

メントの他の成分と溶解剤は、ガラス表面に結合しないかまたはごくわずかに結合するにすぎない。つぎに、残りの成分を含有する流体は、たとえば、吸引によって試料処理槽から除去することが好ましく、一方、ガラス表面は、それに結合した核酸とともに試料処理槽中に残しておく。好ましい態様では、ガラス繊維のフリースの形態の固相を試料処理槽中に入れ、前記混合物とともにインキュベートする。この操作では、核酸はガラス繊維に固定化され、ガラス繊維のフリースとともに試料処理槽から簡単に取り出すことができる。

核酸をリリースさせたのちに検出するばあいは、核酸をプローブとハイブリダイズさせる。叙上のように、このプローブは、検出すべき核酸またはその一部と相補的な塩基配列を有する分子である。このプローブとして好ましいのは、検出される基で標識されたオリゴヌクレオチドである。したがって、反応混合物は、検出すべき核酸が核酸プローブとハイブリダイズする条件下で冷却される。その温度は当業者には知られている。核酸を検出する操作方法の他の態様では、検出すべき核酸は、固相に結合させた核酸プローブとハイブリダイズさせる。この操作では、プローブが反応混合物の他の成分から分離されている限り、プローブはマイクロタイタープレートのキャビティまたは試料処理槽の内壁のような任意の固相に使用できる。核酸プローブ、とくに「捕獲」プローブを固定化する操作は、たとえばヨーロッパ特許出願公開第A-0523557号公報によって、当業者に知られている。

この混合物を冷却したのち、単離または検出される核酸を、溶解混合物および核酸を固相に結合させるのに使

用した薬剤の残留物をまだ含有している周囲の流体から分離する。使用する固相の種類によって、固相は濾過するかもしれないが試料処理槽から取り出すことができ、または前記流体をピペットによって試料処理槽から取り出してもよい。

結合した核酸はつぎに固相から外し、当業者に知られた、核酸配列を検出する通常の操作で直接検出するかまたは標識して検出する。

バージョンB

最初の工程で、溶解剤およびバイオロジカルコンパートメント中に含有されている核酸と結合できるガラス-磁石粒子（ビーズ）とともに、試料をピペットを使って試料処理槽に入れる。その試料処理槽を密閉して振盪する。試料、溶解剤およびガラス-磁石粒子は試料処理槽に入れる必要がある。これらを試料槽に入れる方法とその入れる順序も、本発明が提供する操作方法にとってとくに重要ではない。しかしながら、既知濃度のガラス-磁石粒子を有する懸濁液の状態でガラス-磁石粒子は試料処理槽へピペットを用いて入れることが好ましい。試料は、ガラス-磁石粒子を懸濁させる前または後に、ピペットを使用して試料処理槽中に入れる。試料、ガラス-磁石粒子および溶解剤は、十分に混合するまで振盪することが絶対必要である。

本発明が提供する操作方法の他の工程は、続いてバイオロジカルコンパートメントを崩壊（溶解）させる工程である。バイオロジカルコンパートメントを溶解する操作は当業者には知られており、特定の種類のバイオロジカルコンパートメント、たとえば細胞、に対する特別の

条件を有する操作である。細菌を溶解するには、たとえば、プロテイナーゼKの混合物をバイオロジカルコンパートメントに混合し、つぎにその細胞壁を溶解するかまたは部分的にもしくは完全に分解するのに必要な時間インキュベートしてバイオロジカルコンパートメントに含有されている核酸をリリースさせる。この方法は室温を超える温度で実施することが好ましく、70～95℃の温度がさらに好ましい。細胞を溶解したときに生成する混合物を、以下、溶解混合物ともいう。そのインキュベーション時間は好ましくは5～20分間であり、一層好ましくは10～15分間である。

細胞を室温または室温よりわずかに高い温度で溶解したばあい、その溶解混合物を75℃などの高温まで温めることがとくに好ましく、試料が感染している可能性があるばあいは95℃まで加熱する。溶解によって、つぎの工程が妨害されるば

あい、溶解は不活性化される。

本発明の重要な特徴は、試料処理槽中の混合物をインキュベーションのあいだ、振盪させることである。前記混合物は、時間間隔をおいて振盪してもよく、または全インキュベーション期間中もしくは特定の期間中のみ振盪してもよい。この混合物は、バイオロジカルコンパートメントと磁性粒子とを流体中で十分に混合し、そしてとくに前記ビーズを懸濁または再懸濁させて拡散を促進するために振盪する。このようにすると、バイオロジカルコンパートメントを磁性粒子とに結合させるのに必要な時間が短くなる。

当該溶解混合物は、つぎに、本発明が提供する操作方法を実施する目的によって決まる条件下で冷却される。

このばあい、バイオロジカルコンパートメントからリリースされる核酸は、ガラスー磁性粒子の表面に非特異的に結合するはずである。この結合特性を改善するため、関与するバイオロジカルコンパートメントによって、i-プロパノールまたはエタノールを溶解後の溶解混合物に添加する。つぎに、試料処理槽を振盪して混合物をさらに混合する。ここで核酸が固相の表面に非特異的に結合する。バイオロジカルコンパートメントの他の成分と溶解剤は、ガラス表面に吸着しないか、またはごくわずかの成分だけがガラス表面に吸着するにすぎない。

固相結合ステップが完了したのち、核酸が結合しているガラスー磁性顔料を、試料処理槽の内面に堆積させるために、磁界を生じさせる。残っている流体は処理槽から除去される。しかしながら、好ましい態様では、試料処理槽は底部に流体が流出できる開口を有しているので、流体をこの開口を通じて簡単に吸引することができる。この流体除去法は、磁性粒子にかかる機械的応力が最小になるので、磁性粒子は試料槽の壁から外れることはない。

つぎの工程で、ガラスー磁性粒子を洗浄流体中に再懸濁させる。これを達成するため、磁石を移動させ処理槽から離れさせて、磁性粒子が試料槽の壁にもはや保持されないようにする。叙上のように、試料槽を移動させて磁石から離れさせることも可能である。本明細書に記載された本発明によって、溶液中に磁性粒子を再懸濁させるには磁石を単に移動させるだけでは不十分であり、試料槽を好ま

しくは同時に振動しなければならないことが確認された。この振盪運動は機械振盪器(30)で実施され、

磁性粒子は第2の流体内に均一に分配される。この第2の流体は、磁石を移動させる前後に、たとえば、ピペットによって、試料処理槽に添加することができる。この洗浄工程は、バイオリジカルコンパートメントが十分なレベルの純度に到達するまで、必要に応じて繰り返されることができる。

結合している核酸は、固相から外して、当業者に知られた核酸配列を検出する通常の方法で直接検出するかまた標識してから検出する。

したがって、本発明が提供する操作方法は、1つ以上の試料処理槽を収納する容器(10)；試料処理槽とその中に入っている流体を一定温度に維持するためのサーモスタット装置(20)；試料処理槽を振盪するための機械振盪器(30)；および磁性粒子と、磁力を使って分離し各試料処理槽の壁上に堆積させる装置(40)；を利用する工程の組み合わせに基づいている。驚くべきことには、これらの工程と装置は、単一の反応ブロックに組み合わせることができる。このばあいの反応ブロックは、協働するように連結された装置10、20、30および40のすべてまたはいくつかを備えてなる装置を意味する。本発明によって、従来は多数の手動の調製工程を必要としていたプロセスを1つの装置で実施できるようになる。本発明が提供するこの反応ブロックはとくに有効であることが確認された。核酸をリリースし単離する方法はいまや、本発明のシステムを用いて以前より迅速に実施することができる。また本発明のシステムによれば、前記工程中、試料槽中に核酸をリリースすることが可能になる。このことは、時間を節約し、汚染を回避する点で、現在の技術水準を

越える著しい進歩を示している。従来、懸濁液は通常手作業で試料処理槽を装置から取り出し冷却浴につけることによって冷却されていた。この方法は、今後の日常的な診断検査法としては不十分であることが確認されている。

図3は、本発明が提供する核酸単離法を示す。図3は、以下の実施例に記載されている方法で参照される。試料槽はユニット10の容器の中に配置されている。

試料槽は好ましくは該容器内に嵌合するよう成形されたステム(A20)を備えている(たとえば、ステムは円錐形である)。断面で示されている試料槽、射出成形法を利用し、ポリプロピレンで簡単に製造することができる。

本発明の主な利点は、本発明のシステムが異なる粒径の磁性粒子を使用して広範囲に適用できることである。本発明のシステムは、比較的順応性があり、もっとも多様な方法で使用できる。

本発明の目的を、以下の実施例によって一層詳細に説明する。

実施例 1

本発明が提供する操作方法の基本原理は、核酸診断法に關与する当業者にとって公知である。以下に挙げていない技術の細部は、ジェイ・サムブルック(J. Sambrook)ら、シーエスエイチ(CSH)1989年「モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning)」に見られる。

本発明が提供する、核酸含有の試料溶液を処理する特別の構成の操作方法は、下記の作動工程からなる操作方法である(図3参照)。最初の工程(I)において、細胞を含有する試料流体を、試料槽(A)内で、細胞が結合し、

かつのちに核酸が抽出される物質と共にインキュベートする。この物質は細胞表面に対して特異的な結合特性を有していてもよく、たとえば、表面抗原に対する抗体が吸収物質(A16、図示せず)上に固定される。または、その物質は、流体がその物質を通過して流れるとき、たとえば、流体が試料槽から取り出されるとき、細胞を保持する濾過特性を有していてもよい(A15、図示せず)。細胞を表面に固定化するための条件は、たとえば、米国テネシー州ナッシュビルのバンダービルト大学、分子生物学部のシドニー・フライシャー、ベッカ・フライシャー(Sidney Fleischer, Becca Fleischer)が編集した「メソッズ・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymology)」171巻、バイオメンブレンズ/パート・アール・トランスポート・セオリー：セル：アンド・モデル・メンブレンズ(Biomembranes/Part R Transport Theory: Cell and Model Membranes)444頁以後または581頁以後によって、当業者に知られている。

インキュベーション中、試料槽は好ましくはキャップ(B)で密閉されて、汚

染に対して有効でかつ受動的な防御を確実に行う。

つぎの工程において、流体を試料槽から除去するが、単離すべき核酸を含有する細胞は、物質に結合して試料槽中に残っている。細胞が結合している物質は特定の物質であるから、その物質が磁性であり（ノルウェー国、オスロのダイナル(Dynal)社製造）、そして磁石を外側から試料槽の方へ移動させることで保持は達成される。流体は、わずかに真空を発生させることによって出口（A11）を通じて吸引することができる。これを達成す

るため、出口に、真空が生成したときに開く弁が設置されている。

干渉を起こすことがある、細胞からの残留試料成分を除くため、1回または2回以上の洗浄工程を行う。これらの工程では、存在する汚染物はすべて溶解するが細胞に結合する物質の表面に結合している細胞に対しネガティブな効果をもっていない洗浄流体を試料槽に添加する。この種の洗浄溶液は、たとえば、細胞分離プロトコルまたは核酸用の適当な精製キットプロトコルから当業者には知られている。洗浄溶液は、細胞が物質に結合している方式によって基本的に決まる。

最後の洗浄溶液が試料槽（A）から吸引されると、その精製、濃縮された細胞を適当な溶解流体と接触させて、核酸を細胞からリリースさせる。この溶解溶液の薬剤は、固定化される細胞の種類によって基本的に決まる（ロルフス(Rolfs)ら、（ピーシーアール、クリニカル・ダイアグノスティックス・アンド・リサーチ(PCR, Clinical Diagnostics and Research)、スプリンガー社(Springer Publishers)刊1992年、84頁以後)）。細胞が細菌のばあい、溶解溶液は好ましくは細胞壁を分解するためにプロテイナーゼKを含有している。所望により、溶解は、加熱工程もしくは冷却工程によって、または試料槽を振盪して反応混合物を混合することによって促進することができる。溶解が完了すると、単離すべき核酸は溶液中で自由にえることができる。

また反応槽は、環境からの汚染を防止するため、溶解工程中キャップで密閉することが好ましい。溶解が完了したならば、キャップは、好ましくは適当な機械装置を

用いることによって取り外す。つぎに細胞分解生成物と核酸の混合物が入っている試料槽中に、成形品 (C) を挿入する。そして、その成形品の外側輪郭 (external contour) (C12) は試料槽の内側輪郭 (internal contour) (A17) と適合している。この成形品は中空であり、試料槽と反応混合物の側の末端のフィルター (C11) (各孔質マトリックス) で密閉されている。この成形品 (C) は好ましくは試料槽を密閉するのに適した部材 (B10) を用いて挿入される。このばあい、成形品はキャップで保持され (II)、試料槽を閉じるとき試料槽中に挿入される。このプロセス中、反応混合物がフィルター (C11) を通じて成形品の中空空間 (C14) に入る (IV)。そのフィルターは大きい粒子が中空空間に入るのを防止し、かつ核酸結合特性を有しているので、反応混合物が通過するちょうどそのときに核酸を捕捉する。ガラス繊維を含むフィルターの材料をこのばあいの用途に合わせて選択する。

つぎの工程で、残っている溶解反応混合物を試料槽の出口 (A11) を通じて吸引することによって、AとCとで形成されている装置から除去する。この操作によって、成形品の中空空間 (C14) にはいった溶液を取り出し、このときフィルター中にはできるだけわずかのフィルター残液しか残らない。つぎにキャップ (B) を外すが成形品 (C) は試料槽内に残しておく。

同時にまたはその後直ちに、成形品 (C) と受け入れる溶離槽 (D) を (本発明が提供するシステム内またはその外側で) 準備する。溶離槽にキャップがついているばあいはそれを外す (VI)。好ましくは、たとえばピペ

ットを使って溶離溶液を溶離槽に入れてから、成形品 (C) を溶離槽 (D) 中に挿入する。溶離溶液の組成は、フィルター (C) の材料と結合するタイプの核酸に基づいている。溶離溶液は、固定化された核酸をフィルター材料から溶離させ、たとえば溶解する。当初、溶離槽にかぶせられていたキャップ (B) を、成形品 (C) を有する試料槽 (A) の上に配置する (VII)。

成形品 (C) を試料槽 (A) から外すため、成形品 (C) をキャップ (B) とともに取り外す (VIII)。つぎに、そのキャップと成形品の結合物を溶離槽中に挿入する (IX)。成形品 (C) は好ましくは、成形品を溶離槽 (D) 中に固定する手段

(C13、図示せず)を備え、この手段は、成形品 (C) または槽 (D) が破壊されるばあいまたはキャップ (B) をゆるめて成形品 (C) から外すのに使う力より強い力を使用するばあいしか成形品が槽 (D) から外れないよう保証している。成形品は溶離槽から外すことは意図されていない。

成形品 (C) が溶離槽に入ると、溶離槽中の溶離溶液がフィルター (C11) に入って、固定化されている核酸を固体マトリックスからリリースさせる。溶離槽中の溶離溶液の量によって、フィルターは溶離溶液でちょうど飽和されるか、または溶離溶液および再溶解された核酸が中空空間 (C14) に入る。核酸ができるだけ完全に溶離されることを保証するため、溶離槽の内側輪郭は、成形品の外側輪郭に対してできるだけしっかり嵌合していなければならない。

つぎの工程で、キャップ (B) は、成形品 (C) と溶離槽 (D) の結合体から外される (X)。キャップ (B) を

使って、スタンプ (E) を持ち上げ (XI)、次にスタンプ (E) を成形品 (C) の中空空間中に挿入する (XII)。キャップはスタンプ (E) を内側から把持する。フィルターから流体が押圧面上の開口を通じてスタンプの内空間に入るような力で、スタンプがフィルター (C11) を押圧する。この方法は、押圧面の外側輪郭が、少なくとも押圧しようとしている領域で、成形品 (C) の内側輪郭とぴったり適合しているばあい、とくに効果的である。スタンプ (E) はたとえば、それを適正な位置にスナップ (snap) することによって前記位置に固定することが好ましい。キャップは、この構造で、装置を比較的しっかりと密閉するので、核酸を含有する溶液はこの装置内に貯蔵することができる。

所望の量の核酸溶液を取り出すため、キャップを外し (XIII)、つぎに所望量の溶液を、スタンプの内空間の開口を通じて、たとえばピペットによって取り出す (XIV)。

つぎにキャップはチューブに戻すことができる。

前記操作の工程の順序を以下に示す。

器 具	操 作 者
自動化された（プログラム制御された） インキュベート - 吸引 - 分離（磁性固体相） - 混合／再懸濁	手動 - ピペット - 試験管、ガラスフリース挿入物 およびバックアップ容器を器具 に設置

手動の作動工程はボード体で示す。非手動工程または部分的順序は、たとえば、キーを押すことによって呼び出す。

下記の表では、試料槽Aを試験管と称し、溶離槽Dはバックアップ槽と呼び、成形品Cはガラスフリース挿入物と呼び、スタンプEはプレススタンプと呼んでいる。

工程 #	操 作	時間 (秒)
1	試験管 # 1~16 を反応モジュールに設置する	
2	試験管 # 1~16 にレセプター (50~100 μ l) と SA ビーズ (50~100 μ l) を入れる	
3	試験管 # 1~16 に試料 (1000 μ l) を入れる	
4	試験管をキャップ (各 16 コ) で密閉する	
5	周波数 30Hz (並行) で混合する	30 秒
6	インキュベーション 9 = 4℃、インキュベーション 9 ののち = 室温 (並行)	300~1200 秒
6 *	必要ならばインキュベーションの間混合する	
7	磁石を活性化する (activated) (並行)	5 秒
8	廃棄物を吸引する (連続して 5 秒)	80 秒
9	磁石を脱活性化する (deactivated) (並行)	5 秒
10	試験管のキャップ (各 16 コ) をあける	
11	第 1 洗浄工程 : 500~1000 μ l の洗浄溶液 (低分子量の塩) を試験管 # 1~16 に入れる	
12	周波数 30Hz で再懸濁する (並行)	
13	磁石を活性化する (並行)	
14	廃棄物を吸引する (連続して 5 秒)	
15	磁石を脱活性化する (並行)	
16	第 2 洗浄工程 : 500~1000 μ l の洗浄溶液 (低分子量の塩) を試験管 # 1~16 に入れる	
17	周波数 30Hz で再懸濁する (並行)	5 秒
18	磁石を活性化する (並行)	5 秒
19	廃棄物を吸引する (連続して 5 秒)	80 秒
20	磁石を脱活性化する (並行)	5 秒
20.1	第 3 洗浄工程 (任意) : 500~1000 μ l の洗浄溶液 (低分子量の塩) を試験管 # 1~16 に入れる	
20.2	周波数 30Hz で再懸濁する (並行)	5 秒
20.3	磁石を活性化する (並行)	5 秒

工程 #	操 作	時間 (秒)
20.4	廃棄物を吸引する (連続して5秒)	80 秒
20.5	磁石を脱活性化する (並行)	5 秒
21	試験管 # 1~16 に溶解混合物、試薬 1 + 2 (400 μ l) グアニジウム塩酸塩もしくはグアニジンローダニド (rhodanide)ならびにプロテイナーゼ K (25 μ l) を入れる	
22	試験管をキャップ (各 16 コ) で密閉する	
23	周波数 30Hz で再懸濁する (並行)	5 秒
24	インキュベーション : 9 = 70 °C	600 秒
	[任意 : インキュベーション : 9 = 95 °C、感染の可能性のあるサンプルとともに]	900 秒
25	インキュベーション : 9 = 室温	300 秒
26	試験管をキャップ (各 16 コ) をあける	
27	試験管 # 1~16 に 200 μ l のエタノール (イソプロパノール) を入れる	
28	試験管をキャップ (各 16 コ) で密閉する	
29	周波数 30Hz で再懸濁する (並行)	
30	試験管をキャップ (各 16 コ) をあける	
31	試験管 # 1 のガラスフリース挿入物を試験管 # 1~16 に設置する	
32	廃棄物を吸引する (連続して5秒)	80 秒
33	試験管 # 1~16 へ 500 μ l の洗浄溶液 (カオトロピック塩 / エタノール) を入れる	
34	廃棄物を吸引する (連続して5秒)	80 秒
35	試験管 # 1~16 へ 500 μ l の洗浄溶液 (カオトロピック塩 / エタノール) を入れる	
36	廃棄物を吸引する (連続して5秒)	80 秒
37	装置にバックアップ槽 (# 1~16) を設置する	

工程 #	操 作	時間 (秒)
38	バックアップ槽 (100~200 μ l) および試験管 1~16 に溶出容積(elution volume)をいれる	
39	試験管 # 1 からバックアップ槽 (# 1~16) へガラスフリース挿入物を移す	
40	バックアップ槽にプレススタンプ (# 1~16) を挿入し、溶出する	
41	バックアップ槽 (16 キャップ) を密閉する	
42	試験管 # 1~16 を RM - 廃棄物から取り出す	

所望により、吸引管とキャビティはすすぎ洗いを行ってもよく、したがって、洗浄液で洗浄してもよい（操作手順を実施する前後お呼び試料槽を取り出した後）。

核酸をリリースし単離する別の態様のシステムを図 4 ~ 8 に示す。

図 4 : そのシステムの斜視図

図 5 : そのシステムの部分透視図

図 6 : 試料処理槽の容器

図 7 : 試料槽の容器の断面図

図 8 : 磁石つきプッシング装置

図 4 に示すシステムは試料槽用容器(100)を 4 個備えている。これら容器(100)はキャリア(101)に固定されている。キャリア(101)を動かすと、4 個の容器(110)を一斉に動かして振盪する。部分透視図 (図 5) は、キャリア(101)の運動がどのようにして行われるのかをより詳細に示す。キャリアは、その 2 つの各末端に円形の凹所(102)があり、そのくぼみにロッド(103)が設けられている。このロッド(103)は、偏心位置で電動機(104)の軸に

取り付けられている。したがって、電動機の軸が回転すると、キャリアは平面に沿って運動する。また、部分斜視図 (図 5) は、容器(100)が冷却フィン(105)を備えていることを明確に示している。システムの底部に配置されたベンチレータファン(106)によって、空気流が冷却リブを吹き抜けてシステムを冷却する。

レセプタクル(100)を図6に一層詳細に示す。容器は、試料処理槽を受け入れる6個の別個のキャビティ(107)を備えている。これらのキャビティ(107)は、熱伝導方式で、フレームワーク(108)によってペルチェ要素(109)に接続されている。一方、このペルチェ要素は冷却フィン(105)に接続されている。枠(108)には、温度センサおよびこれらキャビティを温める抵抗加熱装置が入っている。枠(108)は、冷却フィン(105)と熱を交換するペルチェ要素(109)の上に載置されている。試料処理槽は、枠内に配置された発熱体によって温められる。キャビティ(107)は、試料処理槽を冷却するため、ペルチェ要素(109)によって冷却される。ペルチェ要素が反対側に発する熱は、冷却フィン(105)を通じて除かれる。

図7は一つのキャビティ(107)の断面図を示す。このキャビティは、試料槽(110)が配置される円筒形空間で構成されている。試料槽と円筒形の空間は、壁同士が互いに接触して、有効な熱伝導を促進する方式で設計されている。試料槽とキャビティは両者とも、わずかに円錐形であり、すなわち底部に向かってテーパがつけられ、その結果、ぴったりと嵌合している。そのコニシティ (conicity) は $0.5^{\circ} \sim 1^{\circ}$ が好ましい。挿入物がキャビティの下部に配置され、その下部には凹所(112)が設け

られ、その下側にホース継手がねじ止めされている。上部末端に、挿入物(112)は開口を有し、その開口に試料槽(110)のテーパ付き先端が挿入されている。この開口と試料槽のテーパ付き先端とをしっかりと接続するためにOリング形の密封リング(113)が試料槽のテーパ付き先端を囲んで配置されている。試料槽(110)から液体を取り出すには、開口(112)に接続されているチューブによって試料槽(110)内に真空を生成させる。

本発明が提供するこのシステムを操作するばあい、試料槽(110)をキャビティ(107)内に入れたまま磁界を試料槽(110)にかけて磁性粒子を保持させる。図8に示す磁石アセンブリは、上記目的のために、キャビティ(107)の方にむけて、移動させる。

図8は、各々6個ずつキャビティ(107)を有する4個の容器(110)に対応する4×6個の磁石(114)を備えた移動可能なアセンブリを示す。図8に示すアセンブ

りは、6個ずつの磁石からなる4個のユニットが載置されているレール(115)を備えている。そのレール(115)は、キャリア(116)に固定され、一方、そのキャリアは、電動機(117)を保持している。ギヤホイール(図示せず)が、ギヤラック(118)の歯(図示せず)を把握する電動機の軸に取り付けられている。キャリア(116)は、リニヤボールベアリング(119)によって押し出される方式でシリンダ(120)に配置されている。磁性粒子を堆積させるばあいには、磁石(114)の前面がキャビティ(107)の平坦面(121)の近くに直接、配置される。磁石を移動させて、キャビティから離れさせるには、電動機(117)を作動させ、レール(115)を含めてキャリアをリニヤに移動させる。

参照図面リスト

A 試料槽

- 10 入り口
- 11 出口
- 17 内側輪郭
- 19 外側輪郭
- 20 ステムベース
- 22 さらなる機能的な要素が取り付けられうる要素

B キャップ

- 10 試料槽Aを閉じるための要素
- 11 成形品Cを把持するための要素

C 成形品

- 11 多孔質マトリックス
- 12 外側輪郭
- 13 成形品を溶離槽内に固定するための手段
- 14 中空体
- 15 キャップを取りつけるための手段
- 16 内側輪郭
- 17 スタンプEを、すみずみまできっちりと固定するための手段

18 分解しうるステムベース

19 エッジ

D 溶離槽

12 嵌入ノッチ

E スタンプ

10 押圧面

11 外側輪郭

12 内部空間

13 押す面の開口

14 内容物を除去するための開口

15 シール

16 嵌入リング

17 凹所

器 具

1 杵

10 試料槽のためのレセプタクル

11 振動アブソーバ

12 キャビティ

13 ベース

14 Aを加熱および冷却するための入り口

20 試料槽を一定の温度に維持するためのサーモスタットユニット

21 冷却／加熱用ダクト

30 試料槽のためのダクト

40 磁力を用いて磁性粒子を分離するための分離器

41 磁石部を回転するための軸

42 磁石部

50 真空ポンプ／ポンプユニット

- 51 (真空) チューブ
- 100 試料槽のためのレセプタクル
- 101 キャリヤ
- 102 円形の凹所
- 103 ロッド
- 104 電動機
- 105 冷却フィン
- 106 ベンチレータ
- 107 キャビテイー
- 108 粹
- 109 バルチェ要素
- 110 試料槽
- 111 挿入物

- 112 開口
- 113 シールリング
- 114 磁石
- 115 レール
- 116 キャリヤ
- 117 電動機
- 118 ギアロッド
- 119 リニアボールベアリング
- 120 シリンダ

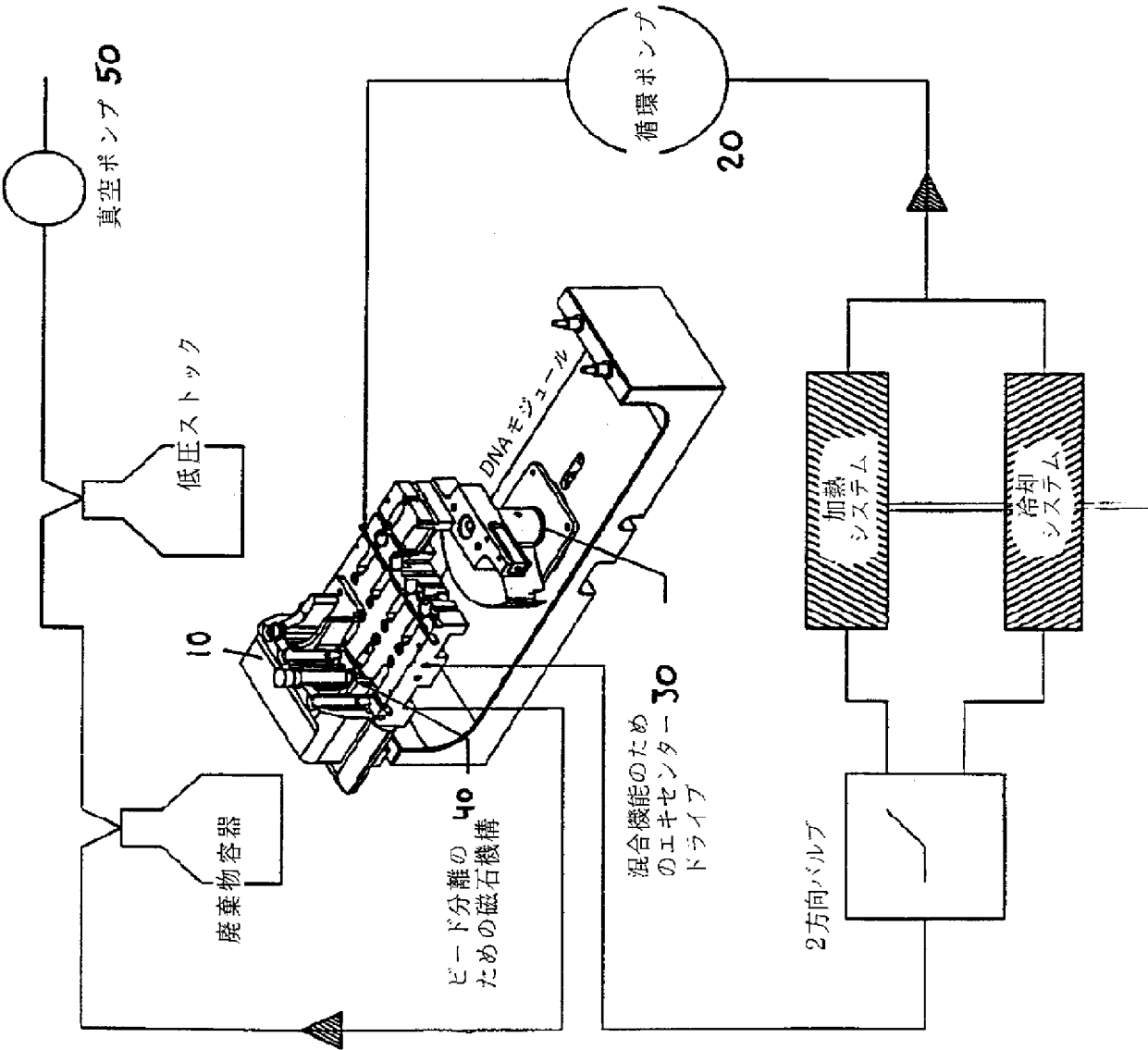
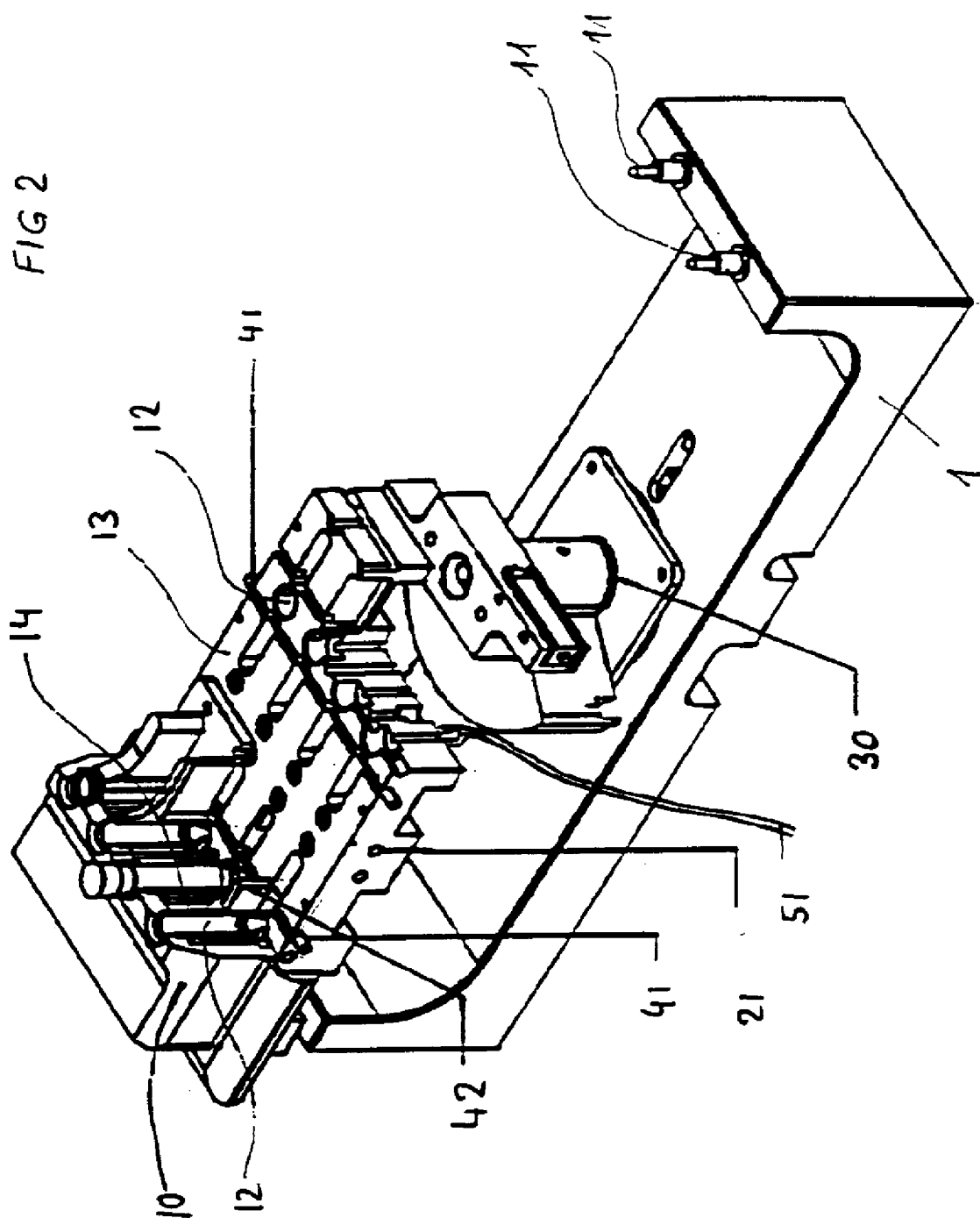


FIG 1

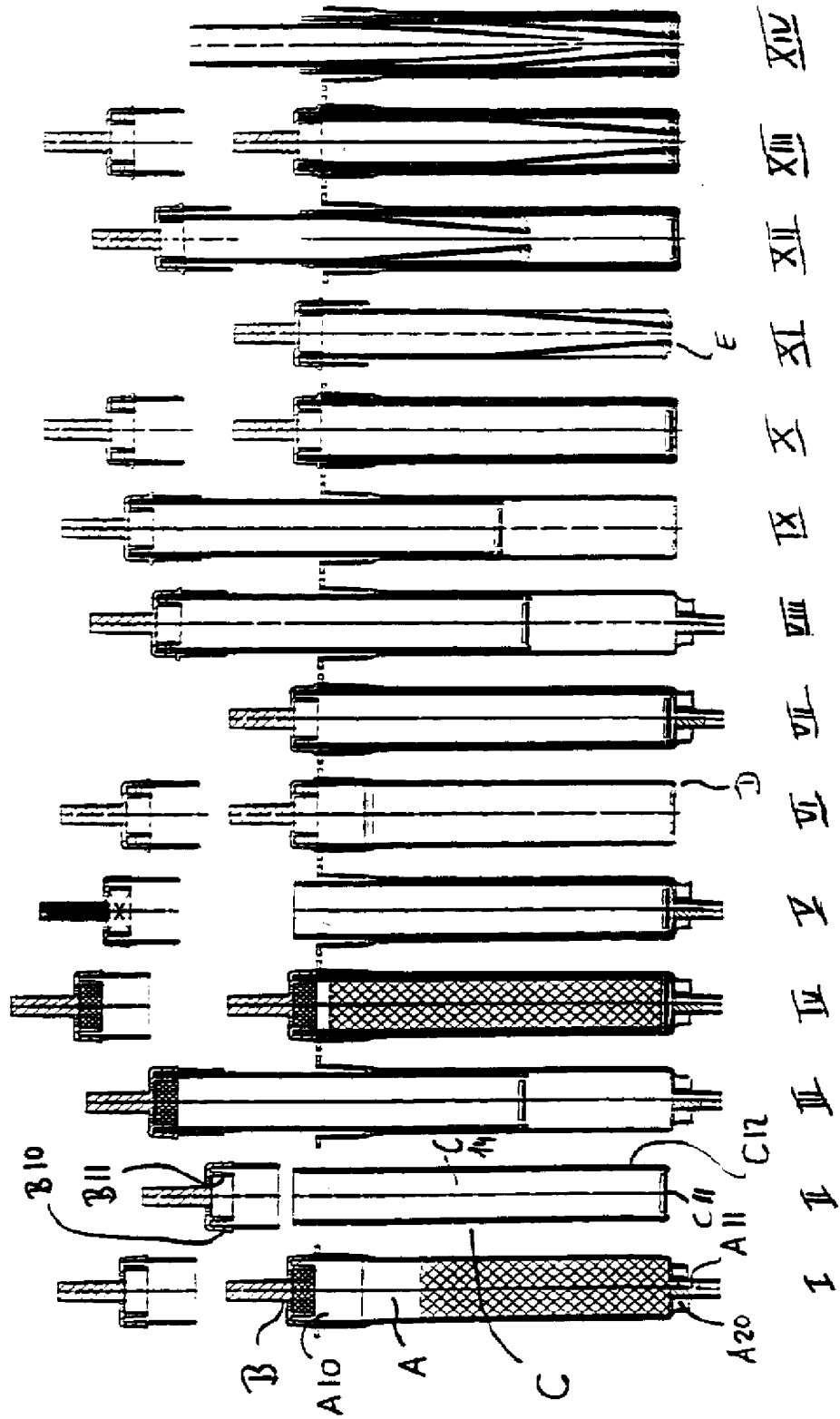
【図 1】

【図2】

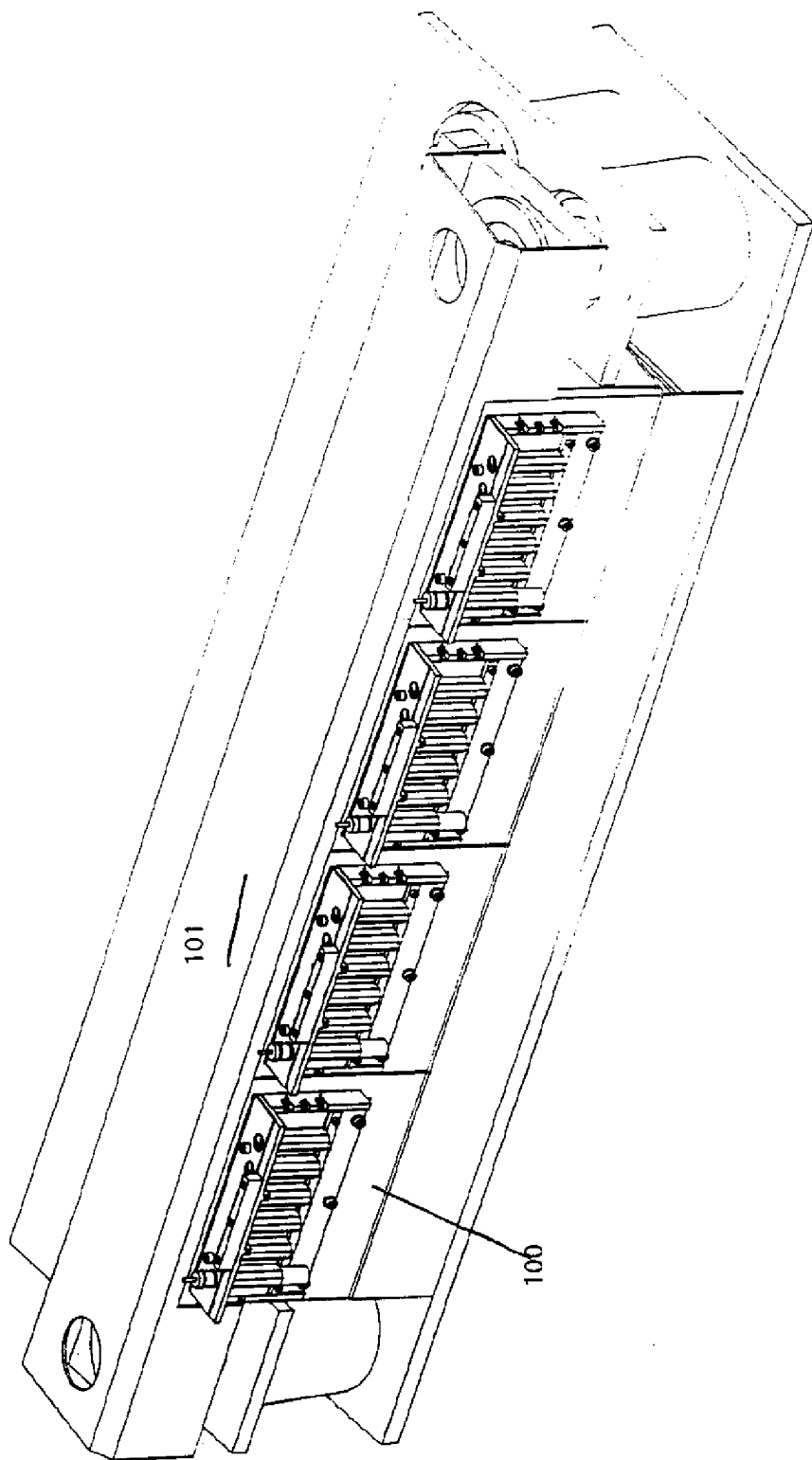


【图3】

FIG 3

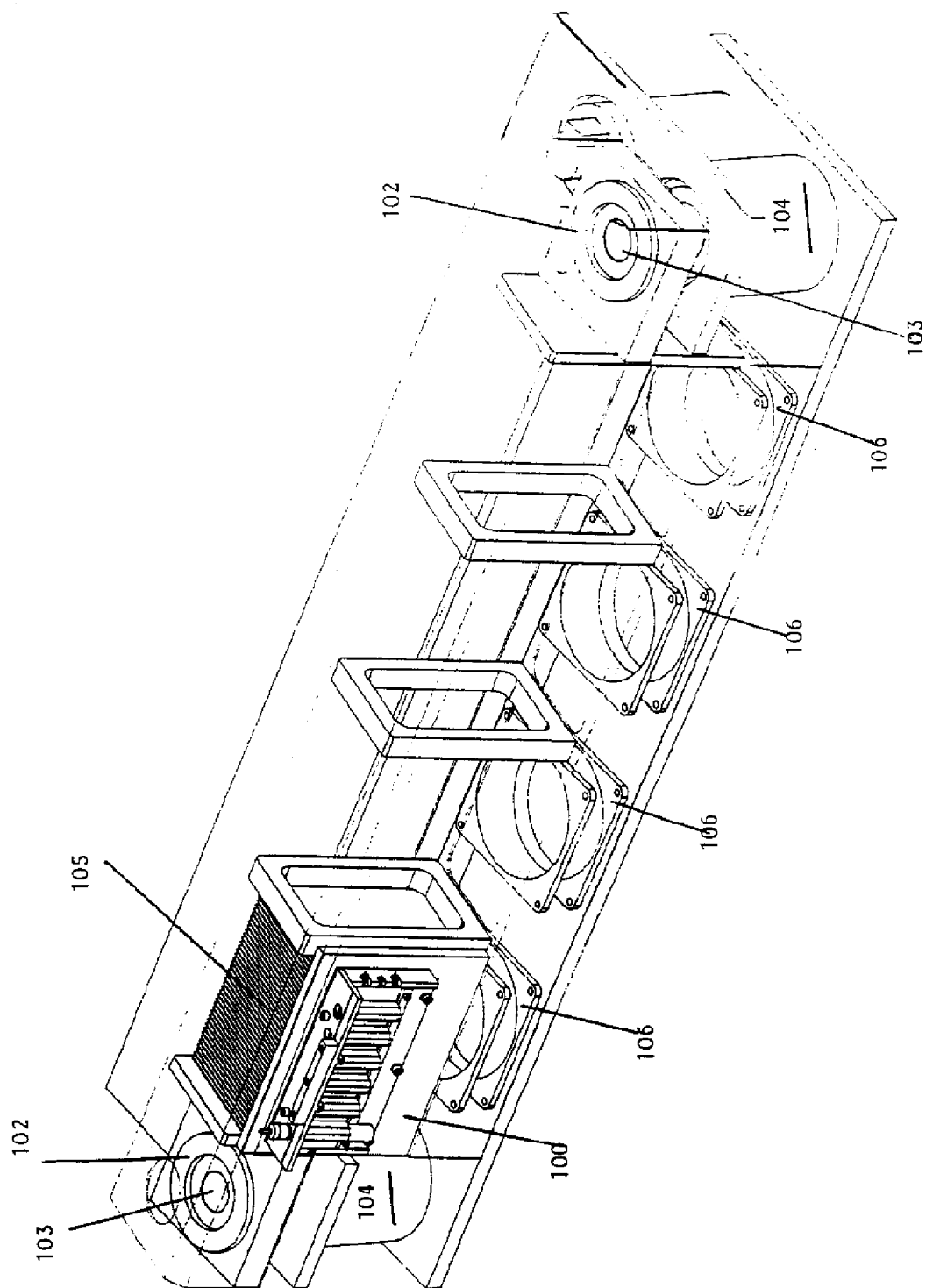


【図4】



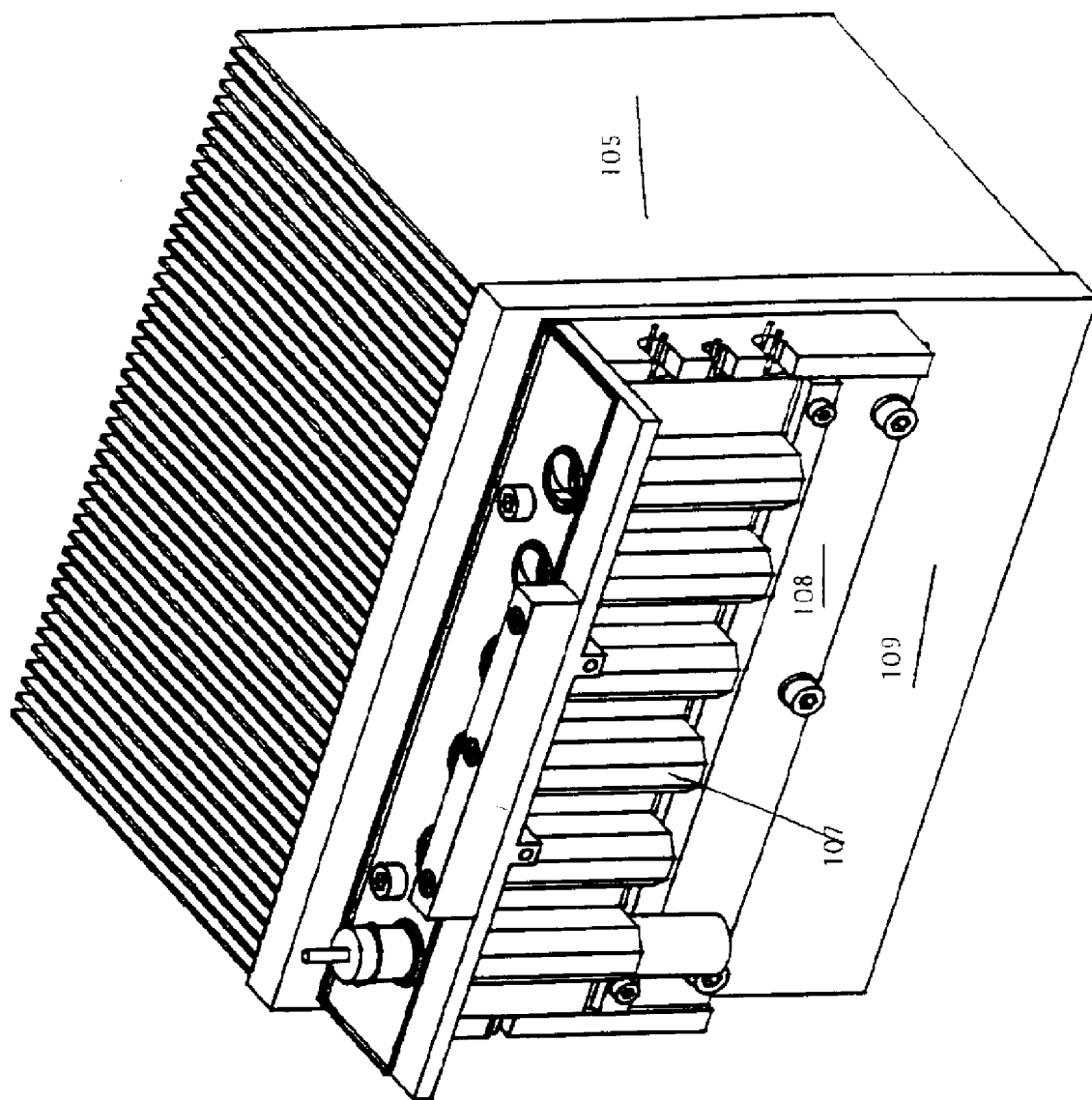
【図5】

FIG 5



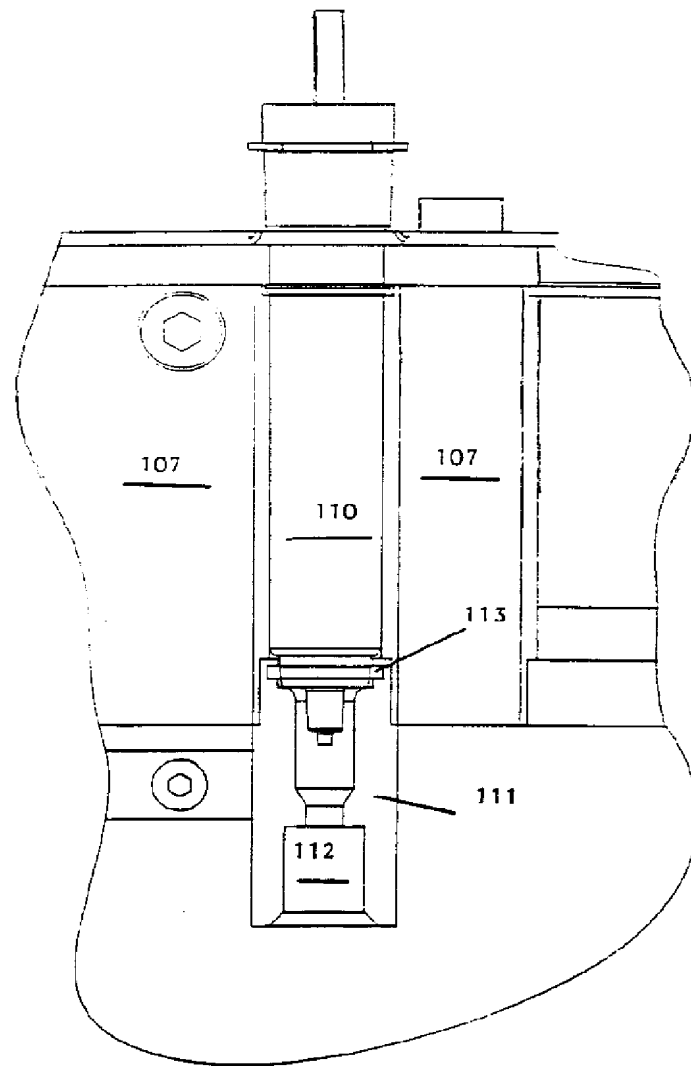
【図 6】

FIG 6



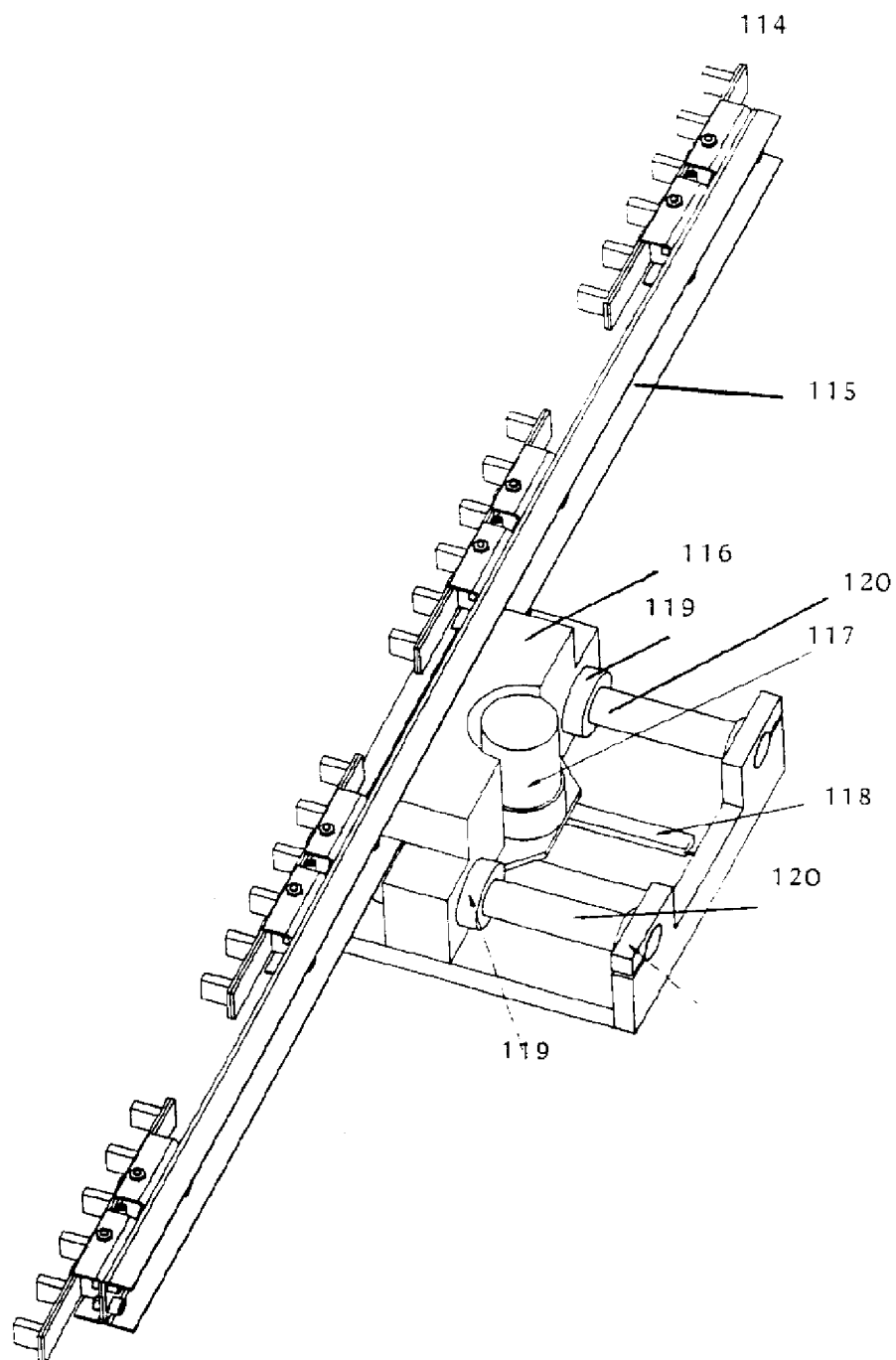
【図7】

FIG 7



【図8】

FIG 8



【手続補正書】特許法第184条の8第1項

【提出日】1997年3月26日

【補正内容】

5. 磁性粒子によるリリースおよび単離のためのシステムであって、

a) 1 または 2 以上の試料処理槽 A を保持するための試料槽 10, 100 のためのレセプタクルと、

b) 該試料処理槽とその内容物とを一定の温度に維持するためのサーモスタットユニット 20 と、

c) 前記試料処理槽 A を振盪するための機械的振盪器 30 と、

d) 磁力によってそれぞれの試料処理槽の壁の上で磁性粒子を分離し、かつ堆積するための分離デバイス 40 とを含み、前記 a)、b) および c) に記載されたユニットが 1 つの反応ブロック内で一体化されるように、互いに協働化されて結合されてなるシステム。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 96/01368

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 6 G01N35/00 B01L7/00 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 6 G01N B01L		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P.X	EP,A,0 687 502 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 20 December 1995	1
P,A	see figure 6; example 1A ---	3-12
A	EP,A,0 389 063 (AKZO NV) 26 September 1990 cited in the application see page 5 - page 8 ---	1,4,5
A	EP,A,0 265 244 (AMOCO CORP) 27 April 1988 see page 10, line 4 - page 11, line 23; figure 4 ---	1-3,5-7, 9
A	WO,A,91 15768 (SYNGENE INC) 17 October 1991 see page 21, line 18 - page 24, line 2; figures 1,2 ---	1,5
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
16 July 1996		02.08.96
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2940, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Hodson, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 96/01368

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO.A.93 25912 (MEDICAL RES COUNCIL; HAWKINS TREVOR LEONARD (US); SULSTON JOHN EDW) 23 December 1993 -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 96/01368

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0687502	20-12-95	DE-A- 4420732 JP-A- 8009957	21-12-95 16-01-96
EP-A-0389063	26-09-90	NL-A- 8900725 AU-B- 641641 AU-B- 5215390 CA-A- 2012777 ES-T- 2085245 JP-A- 2289596 US-A- 5234809	16-10-90 30-09-93 27-09-90 23-09-90 01-06-96 29-11-90 10-08-93
EP-A-0265244	27-04-88	AU-B- 621812 AU-B- 8009787 CA-A- 1309329 DE-A- 3781860 JP-A- 63188399 ZA-A- 8707772	26-03-92 28-04-88 27-10-92 29-10-92 03-08-88 20-04-88
WO-A-9115768	17-10-91	AU-B- 7575291 CA-A- 2080019 EP-A- 0523171	30-10-91 07-10-91 20-01-93
WO-A-9325912	23-12-93	AU-B- 4343993 AU-B- 4344093 WO-A- 9325709	04-01-94 04-01-94 23-12-93

フロントページの続き

- (72)発明者 シューベルト、ウルリッヒ
ドイツ連邦共和国、デー-82319 スター
ンベルク、ハンフェルダー シュトラーセ
31アー
- (72)発明者 コルプ、ウヴェ
ドイツ連邦共和国、デー-82362 ヴェイ
ルハイム、アントン マンゴルトヴェーク
2
- (72)発明者 シュトルツ、ブルクハルト
ドイツ連邦共和国、デー-82386 フーク
ルフィング、リンデンシュトラーセ 4
- (72)発明者 バシュ、マンフレート
ドイツ連邦共和国、デー-82327 ツッチ
ング、クスターマンシュトラーセ 71